



コンドロイチン硫酸N-アセチルガラクトサミン転移酵素1と2の両方が正常な軟骨発生に必須である

著者	新保 未来
発行年	2017
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第8249号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00147910

氏 名	新保 未来
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第 8249 号
学位授与年月	平成 29 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学位論文題目	コンドロイチン硫酸 N-アセチルガラクトサミン転移酵素 1 と 2 の両方が正常な軟骨発生に必須である
主 査	筑波大学教授 博士（医学） 梶 正幸
副 査	筑波大学准教授 博士（医学） 三島 初
副 査	筑波大学准教授 博士（医学） 松坂 賢
副 査	筑波大学助教 博士（理学） 水野 智亮

論文の内容の要旨

新保未来氏の博士学位論文は、コンドロイチン硫酸 N-アセチルガラクトサミン転移酵素 1 と 2 の軟骨発生における役割を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

コンドロイチン硫酸は長い直鎖状の糖鎖であり、グルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンから成る二糖が繰り返した構造を持つ。コンドロイチン硫酸はプロテオグリカンのコア蛋白に共有結合して存在し、発生、再生、恒常性維持に重要な役割を持つ。コンドロイチン硫酸は、コア蛋白に結合したリンケージ 4 糖に、N-アセチルガラクトサミンとグルクロン酸が交互に付加された後、硫酸基が転移されて合成される。二糖の繰り返し構造を合成する糖転移酵素は 6 種類が存在し、その内 N-アセチルガラクトサミン転移酵素 1（CSGalNAcT-1：以後 t1 と略する）と N-アセチルガラクトサミン転移酵素 2（CSGalNAcT-2：以後 t2 と略する）がリンケージ 4 糖に N-アセチルガラクトサミンを転移する initiation 活性を持つこと、t1 の方が t2 より強い initiation 活性を持つことが *in vitro* の研究で明らかにされている。また、先行研究により、t1 ノックアウト（KO）マウスが軟骨形成不全を示し、野生型マウスに比べてわずかに矮小であり、軟骨コンドロイチン硫酸の鎖の数が 50%減少していることが明らかにされている。この結果は、t1 がコンドロイチン硫酸合成に必要なことを示すと同時に、t1 以外にも initiation 活性を持つ糖転移酵素が存在することを意味している。そこで、著者は、t2 KO マウスおよび t1:t2 ダブルノックアウト（DKO）マウスを用いて、t1 と t2 の軟骨形成における役割を明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

（方法）

t1 KO マウス、t2 KO マウス、t1-floxed マウス、t2-floxed マウスは筑波大学生命科学動物資源センターで C57BL/6J マウス由来の ES 細胞における相同組み換えを用いて作成された。著者は、常法に従い、RT-PCR、骨格標本作製、組織学的解析（HE 染色、Safranin-O 染色、免疫組織化学

染色、TUNEL 染色)、軟骨細胞初代培養を行っている。

(結果)

t2 ノックアウトマウスは正常に発育し、生後 5~25 週の体重は野生型と差が無かった。また、胎生 18.5 日のマウスを Alcian blue と Alizarin red で染色した骨格標本において、骨格の大きさ、骨や軟骨の形態に異常は観察されなかった。次に、t1:t2 ダブルノックアウト (DKO) マウスを作成し、DKO マウスが生後チアノーゼを示し死亡することを明らかにしている。組織学的解析で肺胞組織に含気が見られなかったことから、DKO マウスが呼吸不全により死亡すること、t1 単独欠損マウスよりも重篤な表現型を示すこと (t1 と t2 が redundant にはたらくこと) を明らかにしている。胎生 18.5 において、DKO の骨格標本を作製し、骨や軟骨の欠損、変形などの形態異常は無いが、脛骨と上腕骨の長さが t2 KO マウスに比べて有意に減少していることを明らかにしている。

次に Collagen2a1-Cre マウスを用いた軟骨特異的 t1:t2 ダブルノックアウト (Col2-DKO) マウスを作成し、帝王切開により胎生 18.5 マウスを取りだしたところ、53 匹中 10 匹 (18.9%) のマウスが生存すること、しかしながらほとんどが生後 14 日前後で死亡することを明らかにしている。胎生 18.5 の Col2-DKO マウスの脛骨と上腕骨の長さは対照マウスと比べて有意に減少していることを明らかにしている。胎生 18.5 マウスの脛骨近位成長板を Safranin-O 染色すると、t1 KO マウスで野生型に比べて染色強度が減少するが、DKO マウスでは更に染色強度が減少すること、Safranin-O 陽性シグナルが Chondroinase ABC 処理により消失することを明らかにしている。生後 14 日の Col2-DKO マウスの解析では、骨端長の減少、Safranin-O 染色の強度および染色領域の減少、増殖・肥大軟骨細胞層の層構造の著しい乱れが観察された。また、Ki67 陽性細胞の減少と TUNEL 陽性細胞の増加、細胞外マトリクスにおけるアグリン染色の消失が観察された。最後に、初代軟骨細胞を培養し、Col2-DKO マウスの軟骨細胞でグリコサミノグリカン蓄積が減少するが、細胞増殖に変化がないことを明らかにしている。

(考察)

著者は、正常な軟骨の形成において、t1 と t2 が協調してコンドロイチン硫酸合成を行うことを明らかにしている。しかしながら、DKO マウスにおいて Safranin-O 染色が残存していることから、t1 と t2 以外にも initiation 活性を持つ糖転移酵素が存在する可能性を示唆している。DKO マウスと Col2-DKO マウスが生後直ぐに呼吸不全で死亡する原因に関しては、気管軟骨の形成・機能不全による気道狭窄、肋軟骨形成不全による胸郭膨張不全が考えられることを明らかにしている。コンドロイチン硫酸はシグナル分子と結合し細胞外マトリクスにおけるモルフォゲンの勾配形成に関与するモデルが考えられており、Col2-DKO マウスの軟骨で細胞増殖の減少、アポトーシスの亢進が見られたことから、Ihh 蛋白の分布異常、シグナル低下などが起こっている可能性が示唆されている。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、t2 KO マウス、DKO マウス、Col2-DKO マウスを作成し、正常な軟骨の形成において、t1 と t2 が協調してコンドロイチン硫酸合成を行うという重要な結果を得ている。t1 と t2 の両方が軟骨発生に必須であることを示すとともに、さらに未知の糖転移酵素が生体内で initiation 活性を持つ可能性を初めて示した点で重要である。

平成 28 年 12 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。